



unopar

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE**

GEISA DEMELE VALÉRIO

**DESENVOLVIMENTO DE SORVETE FUNCIONAL:
AVALIAÇÃO DE SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS**

Londrina
2014

GEISA DEMELE VALÉRIO

**DESENVOLVIMENTO DE SORVETE FUNCIONAL:
AVALIAÇÃO DE SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS**

Dissertação apresentada à UNOPAR como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Hoch Batista de Souza

Londrina
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação**

D256d Valério, Geisa Demele
Desenvolvimeto de sorvete funcional: avaliação de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais / Geisa Demele Valério. Londrina: [s.n], 2014.
65f.

Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite – Fabricação de Derivados. Universidade Norte do Paraná.
Orientadora: Profª Drª. Cinthia Hoch Batista de Souza

1- Tecnologia do leite- dissertação de mestrado – UNOPAR 2- Sorvete funcional 3- Probiótico 4- Prebiótico 5- Viabilidade I- Souza, Cinthia Hoch Batista de, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 637.1

GEISA DEMELE VALÉRIO

**DESENVOLVIMENTO DE SORVETE FUNCIONAL:
AVALIAÇÃO DE SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS**

Dissertação apresentada à UNOPAR, no mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, área e concentração em Ciência e Tecnologia do Leite como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferido pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Dra. Cíntia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Paraná

Dra. Lina Casale Aragon-Alegro
Universidade Norte do Paraná

Dr. Leandro Freire dos Santos

Londrina, 01 de setembro de 2014.

Dedico esta dissertação às pessoas
que fizeram parte desse processo de aprendizagem,
Renan, Regina, Maurílio, Juliana e Cinthia,
sem as quais não teria chego aonde cheguei
e muito menos vivido o que vivi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo e concretizar meus objetivos, sempre abençoando minhas escolhas.

Aos meus pais, Regina Demele de Carvalho Valério e Maurílio Valério, pelo amor, apoio e todos os incentivos ao estudo.

A minha irmã, Juliana Demele Valério, pela amizade sincera sempre e pelo apoio em todas as decisões que tomei.

A minha avó, Maria Demele, por estar sempre presente em minha vida.

Ao meu namorado, Renan Sabino de Oliveira, por ter me mostrado o lado mais puro e belo do amor, além de ter me apoiado incondicionalmente para a realização desse mestrado.

A minha orientadora, Cinthia Hoch Batista de Souza, por ter acreditado na minha ideia e me ajudado a concretizá-la, e por ter sido muito mais que uma orientadora, uma verdadeira amiga.

A todos os meus professores, que me ensinaram tudo o que sei hoje e construíram em meu conhecimento uma base sólida.

A Evelyn Marssola Castro, pela amizade, fidelidade e companheirismo em todas as horas, principalmente nas difíceis.

A Luciana Jesus Bernini, por ter estado presente e ter ajudado em muitas etapas desse projeto, sendo sempre uma grande amiga.

A todos os alunos da UNOPAR que de alguma maneira me ajudaram na realização desse projeto.

A Flávia Kawahigashi e Geyci Colognesi por sempre estarem dispostas a ajudarem.

Aos meus amigos, sinceros, por sempre estarem presente.

A Fernanda, bibliotecária que me ajudou imensamente.

A todas as pessoas que de um jeito ou de outro me ajudaram e estiveram presente durante a realização desse sonho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

VALÉRIO, Geisa Demele. **Desenvolvimento de sorvete funcional:** avaliação de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. 2014. 65 f. Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

RESUMO

O objetivo desses estudos foi desenvolver cinco formulações de sorvetes funcionais adicionados do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 na presença ou ausência de inulina e avaliar a viabilidade, características físico-químicas e textura, bem como a aceitação sensorial. Para o primeiro estudo, quatro formulações de sorvetes foram produzidas em triplicata: T1 (simbiótico - com adição de La-5 e inulina), T2 (probiótico - com adição de La-5), T3 (prebiótico - com adição de inulina) e T4 (controle - sem adição de La-5 e inulina). As análises de viabilidade do probiótico, físico-químicas (pH e acidez), avaliação sensorial (escala hedônica estruturada de 9 pontos) e textura, foram realizadas semanalmente durante 28 dias, durante o armazenamento dos sorvetes (-18°C). Para o segundo estudo, três formulações de sorvetes foram produzidas em triplicata: T1 (controle – sem La-5 e Bb-12), T2 (probiótico – com adição de La-5) e T3 (probiótico – com adição de Bb-12). As análises de viabilidade dos probióticos e físico-químicas (pH e acidez) foram realizadas para o mesmo período de armazenamento dos sorvetes (-18°C). As contagens de La-5 foram superiores a 7 log UFC/g para todas as formulações durante todo o período de armazenamento. O mesmo foi observado para Bb-12. Após 7 dias de armazenamento, foram observadas populações de La-5 em torno de 7,60 (T1) e 7,43 log UFC/g (T2), e para Bb-12, as populações observadas no dia 7 foram 8,38 log UFC/g. No dia 28, observou-se as populações de 7,47 (T1) e 7,45 log UFC/g (T2), e para Bb-12 8,04 log UFC/g. Não foram observadas reduções significativas no final do armazenamento para La-5 e Bb-12: La-5 apresentou populações de 7,52 (T1) e 7,48 log UFC/g (T2), enquanto Bb-12 apresentou populações de 7,88 log UFC/g. A adição de inulina e La-5 não alterou significativamente o pH e a acidez de T1 e T2, uma vez que os resultados foram semelhantes aos encontrados para T4. Os valores médios de pH entre os dias 7 e 28 foram 6,68 (T1), 6,76 (T2), 6,84 (T3) e 6,84 (T4). No mesmo período, T1, T2 e T4 apresentaram valores médios de 0,16% de acidez, enquanto T3 apresentou valor médio de 0,20%. O sorvete inoculado com Bb-12 apresentou valor médio de pH de 6,64 0,17% para acidez, no mesmo período. Na avaliação sensorial, entre os dias 7 e 28, a pontuação variou entre "gostei moderadamente" a "gostei muito", com valores médios de 7,60-7,50; 7,36-7,80; 7,10-7,06 e 8,06-7,92 para T1, T2, T3 e T4, respectivamente. As análises de textura apresentaram valores médios de dureza em cerca de 0,20 (T1), 0,23 (T2), 0,20 (T3) e 0,19 (T4) para os dias 7, 14, 21 e 28 de análises. Estes resultados demonstram que Bb-12 e La-5 são viáveis para a inserção nessa matriz alimentar e que a adição de inulina não afeta a viabilidade de La-5 nos sorvetes desenvolvidos, uma vez que os sorvetes apresentaram populações satisfatórias de Bb-12 e La-5, mantendo-se acima do mínimo exigido pela legislação brasileira (6 log UFC / g), além de serem bem aceitos pelos consumidores. O parâmetro dureza, avaliado na análise de textura, mostrou que a adição de La-5 com ou sem inulina não afetou a dureza dos sorvetes testados. Portanto, o sorvete pode ser considerado uma excelente matriz alimentar para carrear ingredientes funcionais.

Palavras-chave: Sorvete. Funcional. Probiótico. Prebiótico.

VALÉRIO, Geisa Demele. **Desenvolvimento de sorvete funcional: avaliação de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.** 2014. 65 f. Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The aim of these studies was to develop five functional ice cream formulations added probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 in the presence or absence of inulin and evaluating the feasibility, physical-chemical properties and texture and sensory acceptance. For the first study, four ice-cream formulations were made in triplicate: T1 (symbiotic - with addition of La-5 and inulin), T2 (probiotic - with addition of La-5), T3 (prebiotic - with addition of inulin) and T4 (control - without addition of La-5 and inulin). The probiotic viability analysis, physical-chemical (pH and acidity), sensory evaluation (hedonic scale of 9 points) and texture, were held weekly for 28 days, during storage of ice cream (-18°C). For the second study, three ice cream formulations were produced in triplicate: T1 (control - without La-5 and Bb-12), T2 (probiotic - with addition of La-5) and T3 (probiotic - with addition of Bb-12). The viability of probiotics analysis and physical-chemical properties (acidity and pH) were performed for the same period of storage of the ice cream (-18°C). La-5 counts were greater than 7 log CFU/g for all formulations during the storage period. The same was observed for Bb-12. After 7 days of storage La-5 populations were observed around 7.60 (T1) and 7.43 log CFU/g (T2), and for Bb-12 populations observed on day 7 was 8.38 log CFU/g. On day 28, populations were 7.47 (T1) and 7.45 log CFU/g (T2) for La-5, and 8.04 log CFU/g for Bb-12. Significant reductions in ultimate storage of La-5 and Bb-12 were not observed: La-5 populations were 7.52 (T1) and 7.48 log CFU/g (T2), while Bb-12 showed populations of 7.88 log CFU/g. Inulin addition with La-5 did not significantly alter the pH and acidity of T1 and T2, since the results were similar to those found for T4. The average values of pH between day 7 and 28 were 6.68 (T1), 6.76 (T2), 6.84 (T3) and 6.84 (T4). In the same period T1, T2 and T4 showed mean values of 0.16% of acidity, while T3 averaged 0.20%. Ice cream inoculated with Bb-12 had a mean pH of 6.64 and 0.17% for acidity in the same period. In sensory evaluation, between day 7 and 28, the score ranged from "like moderately" to "liked very much", with mean values of 7.60-7.50; 7.36 to 7.80; 7.10-7.06 and 8.06 to 7.92 for T1, T2, T3 and T4, respectively. The texture analysis showed average hardness values of about 0.20 (T1), 0.23 (T2), 0.20 (T3) and 0.19 (T4) for the 7, 14, 21 and 28 days of analysis. These results demonstrate that Bb-12 and La-5 are viable for inserting food matrix and the addition of inulin does not affect the viability of La-5 developed in ice cream, since the ice cream had satisfactory populations of Bb-12 and La-5, remaining above the minimum required by Brazilian law (6 log CFU/g), and are well accepted by consumers. The hardness parameter evaluated in texture analysis showed that the addition of La-5 with or without inulin did not affect the hardness of the tested ice cream. Therefore, the ice cream can be considered an excellent food matrix to adduce functional ingredients.

Keywords: Ice cream. Functional. Probiotic. Prebiotic.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1	Alimentos funcionais.....	13
3.2	Probióticos.....	14
3.3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i>	15
3.4	Inulina.....	17
3.5	Sorvete	18
4	ARTIGO 1.....	26
5	ARTIGO 2.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	61
7.	ANEXOS.....	62
7.1	Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná (Parecer nº 453.853).....	62
7.2	Modelo de ficha utilizada na análise sensorial.....	65

1 INTRODUÇÃO

A procura por alimentos funcionais está aumentando entre os consumidores, em vista disso, a indústria alimentícia vem inovando ao inserir microrganismos probióticos e substâncias prebióticas nos produtos.

Comumente encontram-se iogurtes e leites fermentados adicionados de probióticos. Outras matrizes alimentares são alvos de estudos, como por exemplo, leite em pó, queijo, sobremesas de base láctea e sorvete (BEDANI et al., 2014; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; CRUZ et al., 2009; HOMAYOUNI et al., 2008a; SOUZA et al., 2008).

Alimentos adicionados de microrganismos probióticos estão sendo amplamente consumidos, principalmente devido aos efeitos benéficos atribuídos à esses microrganismos, como: melhoria da digestão da lactose, atividade anticarcinogênica e antimutagênica, regulação intestinal, atividade antimicrobiana, controle da diarreia e estimulação do sistema imune. No entanto, é importante ressaltar que esses efeitos dependem do tipo de cepa probiótica administrada (BAŞYIĞIT; KULEAŞAN; KARAHAN, 2006; CRUZ et al., 2009).

Assim como os probióticos, a administração de ingredientes prebióticos na alimentação, como a inulina, pode resultar em efeitos benéficos à saúde, como mudanças positivas significativas na microbiota intestinal humana (BRUZZESE et al., 2006; RAMIREZ-FARIAS et al., 2009), uma vez que esses ingredientes não são hidrolisados e nem absorvidos no trato gastrintestinal superior humano. Assim, são capazes de estimular seletivamente a multiplicação de bactérias benéficas no cólon (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002), têm potencial para reprimir patógenos e limitar a virulência dos mesmos por imunoestimulação, promovendo resistência à colonização por microrganismos patogênicos, melhorando assim, a imunidade de quem consome essas substâncias (HAULY; MOSCATTO, 2002; SAAD, 2006).

O sorvete, alimento de alto valor nutricional, é uma opção promissora para o desenvolvimento de produto funcional, pois sabe-se que a incorporação de microrganismos probióticos e inulina nesta matriz não afeta a qualidade global do produto, e, além de ser amplamente consumido por várias faixas etárias, corresponde às expectativas da procura por produtos saudáveis e saborosos ao paladar (SOUZA et al., 2010).

2 OBJETIVOS

ARTIGO 1

Desenvolver quatro formulações de sorvetes funcionais adicionados do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 na presença ou ausência de inulina e avaliar a viabilidade dos probióticos, as características físico-químicas e textura, bem como a aceitação sensorial.

ARTIGO 2

Desenvolver três formulações de sorvetes funcionais adicionados dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e avaliar a viabilidade desses probióticos, bem como as características físico-químicas dos sorvetes.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimento funcional é aquele que além de atender a necessidade nutricional básica do consumidor, quando consumido, resulta em efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde (ROBERFROID, 2000). Para que este tipo de alimento exerça seus efeitos benéficos para a saúde, a ingestão deve ocorrer diariamente (PANDIYAN et al., 2012).

Devido aos efeitos benéficos proporcionados pelos prebióticos e probióticos, os alimentos funcionais estão sendo amplamente consumidos e, em vista desse mercado crescente, se faz necessário o estudo sobre esses ingredientes e sua inserção em alimentos.

A indústria láctea é amplamente favorecida para o desenvolvimento de alimentos funcionais do tipo probióticos, prebióticos e simbióticos, uma vez que esses ingredientes se adaptam bem às bases lácteas e essas por sua vez, são largamente aceitas pelo mercado consumidor (ALVES et al., 2013; CRUZ et al., 2009).

A inserção de probióticos e prebióticos em uma mesma matriz alimentar pode gerar um sinergismo entre esses ingredientes, da mesma forma que ocorre *in vivo*. O prebiótico é metabolizado pelo probiótico principalmente no cólon, tornando-se uma fonte de carbono e energia, aumentando, assim, as populações de probióticos e logo seus efeitos benéficos (HOMAYOUNI et al., 2008a).

A inulina pode resultar em diversos efeitos em formulações alimentícias, como melhorar a estabilidade de emulsões, espumas e géis, aumentar a cremosidade, atuar como agente espessante e ainda reter água (MADRIGAL; SANGRONIS, 2007). Esta ainda é capaz de formar microcristais quando misturada em água ou leite, os quais são responsáveis pela textura finamente cremosa, promovendo na boca uma sensação semelhante à da gordura; esses cristais de inulina possuem a vantagem tecnológica de não serem perceptíveis ao paladar (HAULY; MOSCATTO, 2002).

Dentre as bactérias seletivamente estimuladas pelos prebióticos, destacam-se as bifidobactérias e os lactobacilos (GONÇALVES; EBERLE, 2008), que são os microrganismos probióticos mais utilizados em alimentos (PEREIRA et al., 2010).

A eficiência do probiótico adicionado ao alimento depende da quantidade de

células viáveis adicionadas ao produto, temperatura de armazenamento do alimento, composição da matriz alimentar e presença de oxigênio no produto (HOMAYOUNI et al., 2008a).

Porém, dificuldades como interação interespécies, aumento da acidez, condições da cultura, disponibilidade de nutrientes, agentes promotores e inibidores de crescimento, concentração de açúcares, nível de inoculação, temperatura de incubação e tempo de fermentação podem desfavorecer a viabilidade do probiótico adicionado no alimento (NOUSIA; ANDROULAKIS; FLETOURIS, 2011).

Para garantir uma viabilidade adequada do probiótico no produto, deve-se escolher a cepa adequada a ser inserida no produto, que resista ao processo de fabricação e armazenamento, além de adequar a produção e acondicionamento do alimento para garantir uma maior viabilidade do probiótico, o qual deve estar em concentrações mínimas aceitáveis durante a elaboração, vida de prateleira e consumo do alimento (CRUZ et al., 2009; HOMAYOUNI et al., 2008a; HOMAYOUNI et al., 2008b).

3.2 PROBIÓTICOS

O termo probiótico tem origem grega e significa “para a vida”. A definição atualmente aceita internacionalmente para probióticos é “probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos sobre a saúde humana, deve ser ingerida diariamente a dose mínima de 8-9 log de unidades formadoras de colônias (UFC) (ANVISA, 2008).

Para o seu desenvolvimento, os probióticos requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sais e carboidratos fermentáveis. São acidúricos e se multiplicam em sua maioria, em condição anaeróbia facultativa ou microaerófila (AXELSSON, 2004; MASOOD et al., 2011). Esses microrganismos podem ser homofermentativos, por produzirem mais de 85% de ácido lático a partir de glicose, ou heterofermentativos, por produzirem ácido

lático, CO₂, etanol e/ou ácido acético nas mesmas proporções (AXELSSON, 2004).

Para serem considerados probióticos, os microrganismos devem ser resistentes ao ácido estomacal, bile e enzimas pancreáticas; possuir adesão às células da mucosa intestinal e ter capacidade de colonização do intestino. Além disso, devem possuir origem na microbiota intestinal humana sadia, apresentar capacidade de estabilizar a microbiota intestinal e possuir propriedades antígenotóxicas e não patogênicas; a produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas) contra os microrganismos patogênicos também é observada nos probióticos (BOIRIVANT; STROBER, 2007; SAAD, 2006).

A ação dos microrganismos probióticos no organismo humano pode se dar de diferentes formas: redução do pH intestinal através da fermentação de prebióticos, produção de substâncias inibitórias à multiplicação de microrganismos patogênicos e consumo de nutrientes necessários à multiplicação de patógenos. Além disso, os probióticos podem competir por sítios de adesão na mucosa intestinal (efeito barreira), impedindo que tais microrganismos se multipliquem, modular a resposta imunológica, facilitar a captura de antígenos, produzir enzimas hidrolíticas e diminuir a inflamação do trato gastrointestinal (GOTTELAND; BRUNSER; CRUCHET, 2006; LORENTE; SERRA, 2001).

Os probióticos ainda possuem ação anticarcinogênica, antimutagênica, hipocolesterolêmica, antidiarreica, proporcionam melhoria da digestão da lactose e produzem algumas vitaminas. Além disso, também aumentam a absorção de minerais como cálcio, ferro e magnésio e diminuem a reabsorção de compostos aminados indesejados (JAIN et al., 2004; TAIPALE et al., 2011).

As cepas de microrganismos classificadas pela ANVISA como probióticas são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* shirota, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

3.3 *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*

Os *Lactobacillus* spp., microrganismos Gram-positivos não esporulados, e as *Bifidobacterium*, também Gram-positivos não esporulados, porém anaeróbias, abrangem diversas espécies oficialmente reconhecidas como probióticas, dentre

elas, *L. acidophilus* e *B. animalis* que se destacam por sua grande utilização em alimentos (AXELSSON, 2004; GOMES; MALCATA, 1999; TURRONI et al., 2009).

Diferente de *L. acidophilus* que é homofermentativo obrigatório, por produzir mais de 85% de ácido láctico a partir de glicose; *B. animalis* subsp. *lactis* é heterofermentativa, por produzir ácido láctico, CO₂, etanol e/ou ácido acético nas mesmas proporções (AXELSSON, 2004)

Gomes e Malcata (1999) descreveram que as condições ótimas para a viabilidade desses microrganismos em alimentos dependem de valores de pH entre 6 e 7.

As cepas La-5 e Bb-12, de *Lactobacillus acidophilus* e de *Bifidobacterium animalis*, respectivamente, foram alvos de estudos que demonstraram seus efeitos benéficos. Taipale et al. (2011) demonstraram a manutenção do estado de saúde em crianças de 1 a 8 meses, após ingestão de Bb-12. Tabasco et al. (2009) demonstraram a capacidade de La-5 produzir bacteriocinas contra patógenos.

Shakirova et al. (2012) demonstraram a capacidade das cepas La-5 e Bb-12 resistirem e se adaptarem a meios desfavoráveis, como altas concentrações de carbono, oxigênio, congelamento, pH baixo e sais biliares, devido a suas características hidrofóbicas.

Pereira e Gómez (2007) avaliaram o potencial inibitório de La-5 frente a culturas de *E. coli* e *S. aureus*, responsáveis por desordens como diarreia, infecções no trato gastrintestinal e urinário e doenças de pele (MATTHEWS et al., 2013; KRONENBERG et al., 2011), e obtiveram resultados positivos sobre essa inibição.

Wang et al. (2004) demonstraram que Bb-12 possui atividade inibitória frente ao patógeno *H. pylori in vitro* e, quando consumidos inoculados em iogurte, Bb-12 e La-5 são capazes de reprimir esse patógeno *in vivo* diminuindo a infecção causada pelo mesmo.

Outros alimentos apresentaram resultados favoráveis sobre a viabilidade desses microrganismos, como o queijo (SOUZA et al., 2008); iogurte (BEDANI et al., 2014) e mousse (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). Igualmente, Di Criscio et al. (2010); Pandiyan et al. (2012); Akalin e Erişir (2008), Akin, Akin e Kirmaci (2007) e Corrales, Henderson e Morales (2007) também relataram sucesso na viabilidade de probióticos adicionados em sorvete.

A utilização de probióticos juntamente com prebióticos adicionados em alimentos pode aumentar a viabilidade dos microrganismos probióticos (MARSHALL; GOFF;

HARTEL, 2003). A inulina é uma das substâncias prebióticas mais estudadas em alimentos (SAAD et al., 2011).

3.4 INULINA

A inulina é cientificamente reconhecida como prebiótico (GIBSON; ROBERFROID, 2008). A definição atual de prebiótico é: “ingredientes fermentados seletivamente que permitem mudanças específicas, tanto na composição quanto atividade da microbiota gastrintestinal, conferindo benefícios ao hospedeiro” (ROBERFROID, 2007). Para que determinada substância seja considerada prebiótica, a mesma não pode ser hidrolisada e nem absorvida no estômago, intestino delgado e intestino grosso e, deve ser fermentável pela microbiota saudável presente no intestino humano (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; GIBSON, 2004).

A inulina é um carboidrato formado por subunidades de frutose ligadas entre si e a uma glicose terminal e funciona como reserva dietética em várias plantas e normalmente é extraída da raiz da chicória ou da alcachofra de Jerusalém por meio de difusão em água quente (GIBSON; ROBERFROID, 2008; HAULY; MOSCATTO, 2002). Quando ingerida, a inulina exerce efeitos positivos, como: modificação da capacidade fermentativa do trato gastrintestinal por afetar a composição da microbiota intestinal benéfica e aumentar a biomassa bacteriana, melhoria na absorção de minerais e modulação da resposta imunológica por modificação da microbiota intestinal. Sendo assim, sua fermentação resulta em efeito benéfico local e sistêmico no hospedeiro (BRUZZESE et al., 2006; HAULY; MOSCATTO, 2002; LAVANDA et al., 2011; ROBERFROID, 2007).

Estudos demonstraram ainda, que o consumo de inulina também resulta em alívio da constipação intestinal, possivelmente reduz o risco de osteoporose, diminui níveis séricos de glicose e colesterol e pode apresentar certa ação laxativa (GREG KELLY, 2009; PEREIRA; GIBSON, 2002; SAAD, 2006; MADRIGAL; SANGRONIS, 2007).

A ANVISA determina que a porção do produto prebiótico pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de inulina se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido (ANVISA, 2008).

Esse prebiótico é classificado como fibra solúvel e, pode ser utilizado como substituto de açúcar e/ou gordura na produção de alguns alimentos (GREG KELLY,

2008). A capacidade da inulina em agir como substituto da gordura é devido a sua habilidade em estabilizar a estrutura da fase aquosa, melhorando a cremosidade do produto (KARACA et al., 2009).

Quando utilizada em produtos lácteos, proporciona corpo e palatabilidade e, quando adicionada em sorvetes, a inulina pode melhorar a textura do produto e diminuir o ponto de congelamento do mesmo (MADRIGAL; SANGRONIS, 2007).

Outra vantagem tecnológica da inulina, é que esta pode ser utilizada para enriquecer os produtos alimentares com fibras que podem ser metabolizadas pelos microrganismos probióticos, possuindo a vantagem de não proporcionar sabor adicional ao alimento, mantendo a aparência e sabor das formulações padrões. (HAULY; MOSCATTO, 2002).

A presença de substâncias prebióticas juntamente com microrganismos probióticos em uma mesma matriz alimentar resulta em uma classe de alimentos funcionais definidos como simbióticos (SAAD, 2006).

3.5 SORVETE

De acordo com a ANVISA, sorvete é um produto elaborado basicamente com leite e ou derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares e no qual os teores de gordura e ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares (ANVISA, 1999).

Este alimento pode ser considerado um sistema tetrafásico, onde há glóbulos de gordura, cristais de gelo e bolhas de ar, dispersos em uma fase aquosa de alta viscosidade. Dentre as macromoléculas presentes no sorvete, proteínas, carboidratos e glóbulos de gordura, esta é a responsável pela textura, sabor e cremosidade do alimento, podendo ainda, influenciar o tamanho dos cristais de gelo formados ao longo do processo de batimento da calda (PINTOR; SEVERIANO-PÉREZ; TOTOSAUS, 2013; SILVA JUNIOR; LANNES, 2011).

Tecnologicamente, este produto é considerado como um sistema alimentício coloidal estruturalmente complexo, sendo definido por uma mistura congelada da combinação de leite, adoçantes, estabilizantes, emulsificantes e flavorizantes. Visando a transformação deste alimento em um alimento funcional, o mesmo pode ser adicionado de outros ingredientes ou componentes, como os microrganismos probióticos, substâncias prebióticas, vitaminas, frutas e antioxidantes (MARSHALL;

GOFF; HARTEL, 2003; GOFF; HARTEL, 2006; MARSHALL, 2001).

Essa matriz alimentar pode ser considerada adequada para a inserção de probiótico, tanto por ter componentes necessários à sobrevivência do probiótico como açúcar, gordura e proteína; quanto por possuir pH próximo à neutralidade, favorecendo a sobrevivência do microrganismo (HOMAYOUNI, 2008a). No entanto, existem desafios tecnológicos a serem superados para a incorporação de microrganismos probióticos no sorvete: os microrganismos probióticos empregados devem ser resistentes às operações de processamento, devem resistir à ação do oxigênio incorporado à calda durante o batimento, devem se adaptar ao pH final do produto e devem permanecer viáveis durante o período de armazenamento do produto, resistindo ao congelamento (HOMAYOUNI et al., 2012).

Os glóbulos de gordura e as bolhas de ar do sorvete são isolantes, por diminuírem a disseminação de calor pela massa congelada, além de reduzirem o aumento dos cristais de gelo, minimizando assim, o dano causado à célula microbiana devido a estes (MAGARIÑOS et al., 2007).

Sabe-se que a temperatura de refrigeração (4 a 5°C) pode garantir uma maior taxa de sobrevivência do probiótico nos alimentos. Por outro lado, o congelamento e descongelamento de alimentos que são mantidos congelados, como o *frozen yogurt* e o sorvete podem reduzir a viabilidade do microrganismo probiótico, devido aos danos causados à sua estrutura celular pela formação de cristais de gelo e também pela redução ou interrupção da atividade metabólica microbiana (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

A manutenção da viabilidade de probióticos adicionados ao sorvete, pré-requisito para a funcionalidade destes microrganismos, foi demonstrada em pesquisas realizadas por Nousia; Androulakis e Fletouris (2011) e Pandiyan et al. (2012), que observaram populações de *L. acidophilus* acima de 7,00 log UFC/g. A adição de inulina pode ser um fator favorável à sobrevivência desses microrganismos neste alimento.

Em vista disso, o desenvolvimento de um sorvete adicionado de microrganismos probióticos como o *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* e o prebiótico inulina, apresenta-se como uma alternativa promissora para a obtenção de um alimento com propriedades funcionais.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista das alegações aprovadas de 11 de janeiro de 2005. Atualizada em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 13 nov. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. **Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias>>. Acesso em: 12 abr. 2012.

AKALIN, A.S.; ERIŞIR, D. Effects of Inulin and Oligofructose on the Rheological Characteristics and Probiotic Culture Survival in Low-Fat Probiotic Ice Cream. **Journal of Food Science**, v. 00, n. 0, p. 1-5, 2008.

AKIN, M.B.; AKIN, M.S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, p. 93-99, 2007.

ALVES, L.L. et al. Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 1, p. 63-69, feb. 2013.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S.; von WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria**. 3. rd. New York: Marcel Dekker, 2004. cap. 1. p. 1-67.

BAŞYIĞIT, G.; KULEAŞAN, H.; KARAHAN, A.G. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 796-800, sep., 2006.

BEDANI, R. et al. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **Food Science and Technology**, v. 55, p. 436-443, 2014.

BOIRIVANT, M.; STROBER, W. The mechanism of action of probiotics. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 679-692, nov., 2007.

BRUZZESE, E. et al. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, n. 2, p. 283–287, dec., 2006.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121-129, 2010.

CRUZ, A.G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233-1239, nov., 2009.

DI CRISCIO, T. et al. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4555-4564, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2005. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

GIBSON, G.R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, p. 25-31, 2004.

GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. Ice Cream and Frozen Desserts. In: HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. cap. 154. p. 154-2-154-45.

GONÇALVES, A.A.; EBERLE, I.R. Frozen yogurt com bactérias probióticas. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 291-297, jul./set., 2008.

GOTTELAND, M.; BRUNSER, O.; CRUCHET, S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 8, p. 1077-1086, apr., 2006.

GREG KELLY, N.D. Inulin-Type Prebiotics – A Review: Part 1. **Alternative Medicine Review**, v. 13, n. 4, p. 315-329, dec., 2008.

GREG KELLY, N.D. Inulin-Type Prebiotics – A Review: Part 2. **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 1, p. 36-55, dec., 2009.

HAULY, M.C. de O.; MOSCATTO, J.A. Inulina e oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, dez., 2002.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre-and probiotics. **Food Research International**, v.35, n.2/3, p. 109-116, 2002.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50-55, nov., 2008a.

HOMAYOUNI, A. et al. Factors influencing probiotic survival in ice cream: a review. **International Journal of Dairy Science**, v. 7, n. 1, p. 1-10, jan./mar., 2012.

HOMAYOUNI, A. et al. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. **Journal of Applied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 379-382, 2008b.

JAIN, P.K. et al. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 467-475, 2004.

KARACA, O.B. et al. The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 93-99, 2009.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, jul./set., 2008.

KRONENBERG, A. et al. Active surveillance of antibiotic resistance prevalence in urinary tract and skin infections in the outpatient setting. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 12, p. 1845-1851, dec., 2011.

LAVANDA, I. et al. Prebióticos y su efecto en la biodisponibilidad del calcio. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 333-344, mar./abr., 2011.

LORENTE, B.F.; SERRA, J.D. Alimentos funcionales: probióticos. **Acta Pediátrica Española**, v. 59, n. 3, p.150-155, mar., 2001.

MADRIGAL, L.; SANGRONIS, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 4, p. 387-396, dec., 2007.

MAGARIÑOS, H. et al. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 128-134, may, 2007.

MARSHALL, R.T. Frozen Desserts In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. 2nd. New York: Marcel Dekker, 2001. cap. 4. p. 93-125.

MARSHALL, R.T.; GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. The ice cream industry. In: _____ . **Ice cream**. 6rd. New York: Elsevier, 2003. cap. 1. p.1-10.

MASOOD, M. I. et al. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 91-98, oct., 2011.

MATTHEWS, L. et al. Predicting the public health benefit of vaccinating cattle against *Escherichia coli* O157. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 40, p. 16265-16270, oct., 2013.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 173-182, feb./mar., 2002.

NOUSIA, F.G.; ANDROULAKIS, P.I.; FLETOURIS, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 1-7, feb., 2011.

PANDIYAN, C. et al. Effect of incorporation of inulin on the survivability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic ice cream. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1729-1732, 2012.

PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 259–281, jan., 2002.

PEREIRA, L.C. et al. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in co-culture improve sensory acceptance of potentially probiotic petit-suisse cheese. **Acta Alimentaria**, v. 39, n. 3, p. 265-276, 2010.

PEREIRA, V.G.; GÓMEZ, R.J.H.C. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun., 2007.

PINTOR, A.; SEVERIANO-PÉREZ, P.; TOTOSAUS, A. Optimization of fat-reduced ice cream formulation employing inulin as fat replacer via response surface methodology. **Food Science and Technology International**, v. 00, n. 0, p. 1-12, 2013.

RAMIREZ-FARIAS, C. et al. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 4, p. 541-550, feb., 2009.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 1682-1687, 2000.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: the concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, mar., 2007.

ROBERFROID, M.B. General introduction: prebiotics in nutrition. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., ed. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC, 2008a. p.1-11.

SAAD, S.M.I. et al. Probióticos e prebióticos em alimentos: Aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G. da; FARIA, J. de A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1ed. São Paulo: Varela, 2011. cap. 1. p. 23-50.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, jan./mar., 2006.

SANDERS, M.E. Probiotics: Considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, mar., 2003.

SHAKIROVA, L. et al. *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 85-93, 2013.

SILVA JUNIOR, E. da; LANNES, S.C. da S. Effect of different sweetener blends and fat types on ice cream properties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 217-220, jan./mar., 2011.

SOUZA, C.H.B. de et al. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 871-877, 2008.

SOUZA, J. C. B. et al. Sorvete: composição, processamento e viabilidade da adição de probiótico. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 155-165, jan./mar., 2010.

TABASCO, R. et al. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 109-116, 2009.

TAIPALE, T. et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 409-416, 2011.

WANG, K.Y. et al. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 3, p. 737-741, sep., 2004.

4 ARTIGO 1

**ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS,
REOLÓGICAS E SENSORIAIS DE SORVETE FUNCIONAL ADICIONADO DE
Lactobacillus acidophilus La-5 E INULINA**

VALÉRIO, G. D.¹; CASTRO, E. M.¹; BERNINI, L. J.¹; SANTANA, E. H. W.¹;
ARAGON-ALEGRO, L. C.¹; SOUZA, C. H. B.^{1*}

¹ Universidade Norte do Paraná – UNOPAR – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Rua Marselha, 591, Jardim Piza, 86041-140, Londrina, PR, Brasil.

* Corresponding author: C. H. B. Souza

E-mail: cinthiahoch@yahoo.com.br

Tel.: +55 43 3371-7993

Fax: +55 43 3371-7834

Running headline: Desenvolvimento de sorvete funcional.

Resumo

O sorvete, alimento de alto valor nutricional e amplamente consumido, apresenta-se como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de um alimento funcional. Para se tornar tal produto, o mesmo pode ser enriquecido com a adição de microrganismos probióticos e substâncias prebióticas como a inulina. O objetivo deste estudo foi desenvolver quatro formulações de sorvetes funcionais adicionados do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 na presença ou ausência de inulina e avaliar a viabilidade, características físico-químicas e textura, bem como a aceitação sensorial. Para isso, quatro formulações de sorvetes foram produzidas em triplicata: T1 (simbiótico - com adição de La-5 e inulina), T2 (probiótico - com adição de La-5), T3 (prebiótico - com adição de inulina) e T4 (controle - sem adição de La-5 e inulina). As análises de viabilidade do probiótico, físico-químicas (pH e acidez), avaliação sensorial (escala hedônica estruturada de 9 pontos) e textura, foram realizadas semanalmente durante 28 dias, durante o armazenamento dos sorvetes (-18°C). As contagens de La-5 foram superiores a 7 log UFC/g para todas as formulações durante todo o período de armazenamento. Após 7 dias de armazenamento, foram observadas populações de La-5 em torno de 7,60 (T1) e 7,43 log UFC/g (T2), e no dia 28, observou-se as populações de 7,47 (T1) e 7,45 log UFC/g (T2). Não foram observadas reduções significativas no final do armazenamento para La-5, que apresentou populações de 7,52 (T1) e 7,48 log UFC/g (T2). A adição de inulina e La-5 não alterou significativamente o pH e a acidez de T1 e T2, uma vez que os resultados foram semelhantes aos encontrados para T4. Os valores médios de pH entre os dias 7 e 28 foram 6,68 (T1), 6,76 (T2), 6,84 (T3) e 6,84 (T4). No mesmo período, T1, T2 e T4 apresentaram valores médios de 0,16% de acidez, enquanto T3 apresentou valor médio de 0,20%. Na avaliação sensorial, entre os dias 7 e 28, a pontuação variou entre "gostei moderadamente" a "gostei muito", com valores médios de 7,60-7,50; 7,36-7,80; 7,10-7,06 e 8,06-7,92 para T1, T2, T3 e T4, respectivamente. As análises de textura apresentaram valores médios de dureza em cerca de 0,20 (T1), 0,23 (T2), 0,20 (T3) e 0,19 (T4) para os dias 7, 14, 21 e 28 de análises. Estes resultados demonstram que La-5 é viável para a inserção nessa matriz alimentar e que a adição de inulina não afeta a viabilidade desse microrganismo nos sorvetes desenvolvidos, uma vez que os sorvetes apresentaram populações satisfatórias de La-5, mantendo-se acima do mínimo exigido pela legislação brasileira (6 log UFC / g), além de serem bem aceitos pelos consumidores. O parâmetro dureza, avaliado na análise de textura, mostrou que a adição de La-5 com ou sem inulina não afetou a dureza dos sorvetes testados. Portanto, o sorvete pode ser considerado uma excelente matriz alimentar para carrear ingredientes funcionais.

Palavras-chave: Sorvete. Funcional. Probiótico. Prebiótico.

Abstract

The ice cream, high nutritional value and widely consumed food, is presented as a promising alternative for the development of a functional food. To make such a product, it can be fortified with the addition of probiotic micro-organisms and prebiotic substances such as inulin. The objective of this study was to develop four functional ice cream formulations added *Lactobacillus acidophilus* probiotic microorganism La-5 in the presence or absence of inulin and assess the feasibility, physicochemical characteristics and texture, as well as sensory acceptance. To do so, four ice-cream formulations were made in triplicate: T1 (symbiotic - with addition of La-5 and inulin),

T2 (probiotic - with addition of La-5), T3 (prebiotic - with the addition of inulin) and T4 (control - without addition of La-5 and inulin). The probiotic viability analysis, physical-chemical (pH and acidity), sensory evaluation (hedonic scale of 9 points) and texture, were held weekly for 28 days, during storage of ice cream (-18 ° C). La-5 counts were greater than 7 log CFU / g for all formulations during the storage period. After 7 days of storage, La-5 populations were observed around 7.60 (T1) and 7.43 log CFU / g (T2), and day 28 was observed populations 7.47 (T1) and 7.45 log CFU / g (T2). There were no significant reductions in ultimate storage La-5, which showed 7.52 populations (T1) and 7.48 log CFU / g (T2). The addition of inulin and La-5 did not significantly alter the pH and acidity T1 and T2, since the results were similar to those found for T4. The average values of pH between 7 and 28 were 6.68 (T1), 6.76 (T2), 6.84 (T3) and 6.84 (T4). In the same period, T1, T2 and T4 showed mean values of 0.16% of acidity, while T3 averaged 0.20%. In sensory evaluation, between 7 and 28, the score ranged from "like moderately" to "liked", with mean values of 7.60-7.50; 7.36 to 7.80; 7.10-7.06 and 8.06 to 7.92 for T1, T2, T3 and T4, respectively. The texture analysis showed average hardness values of about 0.20 (T1), 0.23 (T2), 0.20 (T3) and 0.19 (T4) for the 7, 14, 21 and 28 analysis. These results demonstrate that 5-La is feasible to insert the food matrix and that the addition of inulin does not affect the viability of this microorganism developed in ice cream, since the ice cream had a satisfactory population of La-5 and remained above the minimum Brazilian required by legislation (6 log CFU / g), and they are well accepted by consumers. The hardness parameter evaluated in texture analysis showed that the addition of La-5 with or without inulin did not affect the hardness of the tested ice cream. Therefore, the ice cream can be considered an excellent food matrix to adduce functional ingredients.

Keywords: Ice cream. Functional. Probiotic. Prebiotic.

1. Introdução

A nutrição otimizada, que possui por objetivo maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, assegurando o bem-estar e a saúde, engloba o conceito de alimentos funcionais, que são alimentos que além das propriedades nutricionais básicas, são capazes de promover a saúde de quem os consome (SAAD, 2006).

O sorvete, por ser um alimento de alto valor nutricional e ser amplamente aceito e consumido por várias faixas etárias, se apresenta como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de um alimento funcional.

Este produto, considerado um sistema alimentício coloidal estruturalmente complexo (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003; GOFF; HARTEL, 2006; MARSHALL, 2001); é definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como um alimento elaborado basicamente com leite e ou derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares e no qual os teores de gordura e ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares (ANVISA, 1999).

Visando o desenvolvimento de um sorvete funcional, o mesmo pode ser adicionado de outros ingredientes ou componentes, como microrganismos probióticos, substâncias prebióticas, vitaminas e antioxidantes (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003; GOFF; HARTEL, 2006; MARSHALL, 2001).

Probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). Dentre esses benefícios, podem ser citados as ações anticarcinogênica, antimutagênica, hipocolesterolêmica e antidiarreica, a melhoria da digestão da lactose e a produção de algumas vitaminas, além do favorecimento da absorção de minerais como cálcio, ferro e magnésio e a diminuição da reabsorção de compostos aminados indesejados (JAIN et al., 2004; TAIPALE et al., 2011).

Para que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos sobre a saúde humana, deve ser ingerida diariamente a dose mínima de 8-9 log de unidades formadoras de colônias (UFC) (HOIER et al., 1999).

A fim de auxiliar na manutenção e, até mesmo, aumentar a viabilidade dos microrganismos probióticos adicionados em alimentos, pode-se adicionar à mesma matriz alimentar substâncias prebióticas (GREG KELLY, 2008; ROBERFROID, 2007); como a inulina, um dos prebióticos mais estudados em alimentos (SAAD et al., 2011). No entanto, é importante ressaltar que a adição destes componentes não devem alterar as características sensoriais e físico-químicas dos alimentos ao longo do armazenamento (ROY, 2005; SOUZA et al., 2008).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir diferentes formulações de sorvetes suplementados ou não com o microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 e inulina, e avaliar suas características físico-químicas, microbiológicas e de textura, além da aceitação sensorial.

2. Material e Métodos

2.1 Ingredientes para a fabricação dos sorvetes

Para as produções das diferentes formulações de sorvetes foram utilizados os seguintes ingredientes: leite integral UHT (Tirol®, Treze Tílias, Brasil), açúcar refinado (Alto Alegre®, Presidente Prudente, Brasil), creme de leite UHT (Polly®, Londrina, Brasil), leite condensado (Mococa®, Mococa, Brasil), emulsificante

Emustab® (Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul, Brasil), estabilizante (Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul, Brasil), aroma de baunilha (Mix®, São Bernardo do Campo, Brasil), cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* (Christian Hansen®, Hoersholm, Dinamarca) e inulina Beneo GR (Orafti®, Oreya, Bélgica). As variáveis empregadas na fabricação das formulações e as proporções de cada ingredientes estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Os sorvetes foram processados de acordo com as etapas descritas na Figura 1.

Tabela 1. Variáveis empregadas na fabricação dos sorvetes.

Sorvetes	Cultura probiótica*	Inulina**
T1	+	+
T2	+	-
T3	-	+
T4***	-	-

+ = Presença - = Ausência.

* Cultura probiótica: *Lactobacillus acidophilus* (La-5, Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

** Inulina Beneo GR: 92% Inulina + 8% (glicose + frutose + sacarose); Grau de polimerização > 10 (Orafti, Oreya, Bélgica).

*** Formulação controle.

Tabela 2. Ingredientes e suas respectivas quantidades utilizadas em cada formulação de sorvete elaborada.

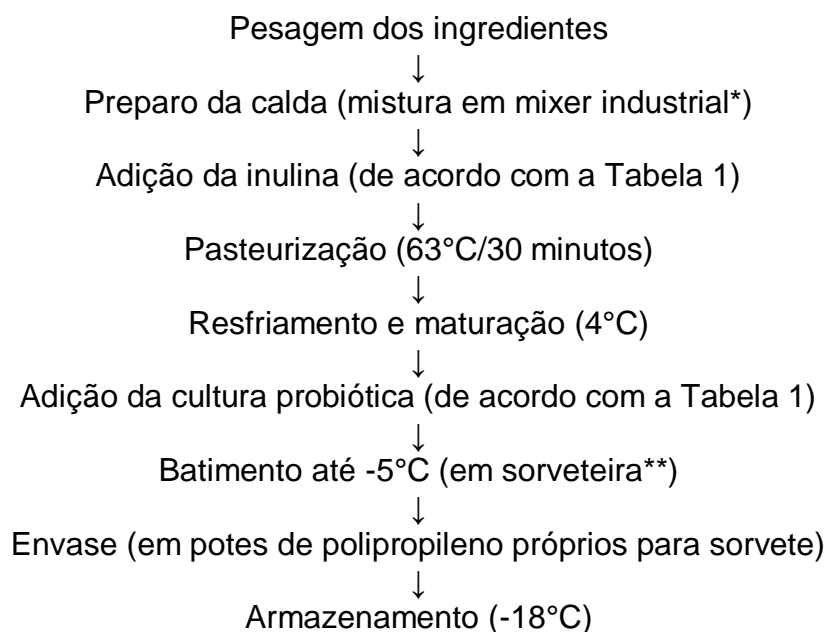
Ingredientes	Quantidade			
	Formulações			
	T1	T2	T3	T4*
Leite integral	4000 mL	4000 mL	4000 mL	4000 mL
Creme de leite	1200 g	1200 g	1200 g	1200 g
Leite condensado	1185 g	1185 g	1185 g	1185 g
Açúcar refinado	300 g	300 g	300 g	300 g
Emulsificante	150 g	150 g	150 g	150 g
Estabilizante	150 g	150 g	150 g	150 g
Essência de baunilha	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL
Cultura probiótica**	4 g	4 g	-	-
Inulina***	15 g	-	15 g	-

- = Ausência.

* T4: formulação controle.

**Cultura probiótica: *Lactobacillus acidophilus* (La-5, Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

*** Inulina Beneo GR: 92% Inulina + 8% (glicose + frutose + sacarose); Grau de polimerização ≥ 10 (Orafti, Oreya, Bélgica).



* Etapa realizada em Mixer 15 (Finamac, São Paulo, Brasil).

** Etapa realizada em sorveteira (Polo Sul, São Carlos, Brasil).

Figura 1. Fluxograma para fabricação dos sorvetes.

2.2 Período de armazenamento

Os sorvetes foram armazenados em freezer a -18°C por um período de 28 dias. Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas, de textura e de aceitação sensorial, semanalmente. A análise centesimal foi realizada após 1 dia de armazenamento dos sorvetes.

2.3 Análises microbiológicas

2.3.1 Avaliação das populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5

Para a avaliação das populações de La-5, foram homogeneizadas porções de 25 gramas de sorvete com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” (Interscience, St. Nom, França), com diluições decimais subsequentes no mesmo diluente, alíquotas de 1 mL das diluições foram transferidas para placas de Petri estéreis, adicionadas posteriormente de ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (Himedia, Mumbai, Índia), fundido e resfriado a 45°C. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1995). As análises foram realizadas em duplicata.

2.3.2 Avaliação das populações de microrganismos contaminantes

Foram avaliadas as populações dos seguintes microrganismos contaminantes: coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e bolores e leveduras, de acordo com o preconizado pela ANVISA para alimentos classificados como gelados comestíveis (ANVISA, 2001). As diluições foram preparadas conforme descrito no item 2.3.1. Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™ Yeasts and Moulds Count Plates (Petrifilm™ YM, 3M Microbiology, St. Paul, EUA), para contagem de bolores e leveduras, e para placas Petrifilm™ EC, para enumeração de coliformes totais e *E. coli*. As placas Petrifilm™ EC foram incubadas a 37°C por 24 e 48 horas, para determinação das populações de coliformes totais e de *E. coli*, respectivamente, e as placas Petrifilm™ YM, incubadas a 25°C por 5 dias, de acordo com as instruções do fabricante. Para a determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm™ Staph Express (3M), incubadas a 37°C por 24 horas (SILBERNAGEL et al., 2003).

2.4 Determinação do pH, acidez livre titulável e overrun

Foram realizadas as análises de pH com o auxílio de potenciômetro (Tecnal, Piracicaba, Brasil) e acidez livre titulável através de titulação com solução Dornic, (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2005) ambas em triplicata. O overrun (determinação da proporção de ar incorporado à calda durante o batimento e congelamento) foi determinado a partir de uma amostra de cada formulação produzida, de acordo com Muse e Hartel (2004), através do seguinte cálculo:

$$\text{overrun (\%)} = \frac{p_{\text{calda}} - p_{\text{sorvete}}}{p_{\text{sorvete}}} \times 100$$

onde p = peso em 250 mL.

2.5 Análise centesimal

As determinações de lipídeos, proteínas, extrato seco total, cinzas e umidade foram realizadas, no dia seguinte à produção, de acordo com metodologia preconizada pela Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1995). O teor de carboidratos foi calculado por diferença. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Determinação da dureza

Para a realização das análises de dureza, os sorvetes foram armazenados em potes plásticos contendo 60 gramas. Anteriormente ao teste, as amostras armazenadas em freezer a -18°C foram transferidas para BOD e mantidas em temperatura controlada de -5°C , durante um período de 20 horas. A dureza foi determinada através de teste de penetração utilizando-se probe cônico acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45° (TA15/1000) em texturômetro Texture Analyser CT3 (Brookfield Engineering Labs, Middleboro, EUA) controlado por computador. Os dados foram coletados através do software Texture CT V1.4 Build 17. Todas as análises foram realizadas em sextuplicada, utilizando-se a velocidade de teste de 1 mm/s e a distância de 10 mm, conforme estabelecido por Karaman et al. (2014).

2.7 Análise sensorial

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná (Anexo 6.1), a análise sensorial foi conduzida segundo o delineamento de ordenação em blocos casualizados com 50 provadores não treinados em cada período, empregando-se teste de aceitação, utilizando-se uma escala hedônica estruturada de 9 pontos com variação de gostei muitíssimo (ou 9 pontos) a desgostei muitíssimo (ou 1 ponto) (Anexo 6.2) (DUTCOVSKY, 2013; LAWLESS; HEYMANN, 1999). As amostras foram servidas aos provadores, que estavam em cabines individuais sob luz branca, em porções de 10 gramas e o delineamento empregado foi o de blocos incompletos balanceados, com apresentação monádica das amostras.

2.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o software STATISTICA v.8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). A normalidade dos resultados e a homogeneidade de variâncias foram avaliadas através do teste de Shapiro-Wilks e Brown-Forsythe, respectivamente, adotando-se α de 0,05. Quando a homogeneidade de variância não foi observada, os dados foram tratados através de análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Kruskal Wallis e o teste de Mann Whitney U para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998b). Quando a homogeneidade de variâncias foi observada, procedeu-se à análise de variância paramétrica e consequente aplicação do teste de Tukey

para a identificação das diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998a; BOWER, 1998b; CALLEGARI-JAQUES, 2003). Para as comparações entre os diferentes períodos de armazenamento para uma mesma formulação: quando a homogeneidade de variância não foi observada, os dados foram tratados pela análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Friedman e o “LSD rank” para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1998b). Quando houve a homogeneidade de variâncias, procedeu-se à análise de variância para medidas repetidas e aplicação do teste de Tukey para detectar as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias (BOWER, 1998a).

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise centesimal

Todas as formulações de sorvete apresentaram composição semelhante em relação à proteínas, cinzas, umidade e carboidratos. A formulação T4 apresentou maior quantidade de lipídeos em relação às demais ($p < 0,05$), o que se deve, provavelmente, à composição da matéria prima, uma vez que lotes diferentes de leite foram utilizados para as produções (tabela 3).

Tabela 3. Análise centesimal (média \pm desvio-padrão) obtida para os sorvetes T1 (simbiótico, com adição de *L. acidophilus* e inulina), T2 (adição de *L. acidophilus*), T3 (adição de inulina) e T4 (controle, sem adição de *L. acidophilus* e inulina), após 1 dia de armazenamento a -18°C .

Composição	Sorvetes			
	T1	T2	T3	T4
Lipídeos	7,67 \pm 0,16 ^A	7,75 \pm 0,20 ^A	7,19 \pm 0,15 ^A	8,28 \pm 0,14 ^B
Proteína	3,13 \pm 0,50 ^A	2,87 \pm 0,28 ^A	3,40 \pm 0,26 ^A	2,87 \pm 0,42 ^A
Cinzas	0,85 \pm 0,04 ^A	0,92 \pm 0,01 ^A	0,90 \pm 0,02 ^A	0,83 \pm 0,02 ^A
Umidade	67,99 \pm 0,10 ^A	67,30 \pm 0,20 ^A	68,00 \pm 0,07 ^A	66,62 \pm 0,17 ^A
Carboidratos	20,36 \pm 0,65 ^A	21,15 \pm 0,27 ^A	20,50 \pm 0,16 ^A	21,39 \pm 0,47 ^A

^{A,B}: letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes sorvetes avaliados no mesmo período de armazenamento.

Buyck, Baer e Choi (2011) avaliaram o efeito da temperatura de armazenamento na qualidade de sorvete e verificaram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para cinzas (0,88%) e proteínas (2,97%), entretanto valores maiores para gordura (10,3%).

Outros autores encontraram resultados diferentes aos deste trabalho. Başıyğit, Kuleaşan e Karahan (2006) observaram umidade de 62% em sorvetes produzidos

com adição de sacarose. Homayouni et al. (2008) ao avaliarem o efeito da microencapsulação e amido resistência na sobrevivência de probiótico e propriedades sensoriais de sorvete simbiótico, obtiveram o teor de 8,10% de gordura no sorvete.

Pandiyani et al. (2012) verificaram 10% de gordura, em média, em sorvetes probiótico, probiótico adicionado de concentrado proteico de soro (whey protein concentrate – WPC) e simbiótico adicionado de WPC.

3.2 Análises físico-químicas – pH e acidez livre titulável

Os valores de pH e acidez se mantiveram próximos para todas as formulações de sorvete, demonstrando que a incorporação do microrganismo probiótico La-5 e do prebiótico inulina não alterou significativamente estes parâmetros físico-químicos dos sorvetes desenvolvidos (tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos (média \pm desvio-padrão) obtidos para os sorvetes T1 (simbiótico, com adição de *L. acidophilus* e inulina), T2 (adição de *L. acidophilus*), T3 (adição de inulina) e T4 (controle, sem adição de *L. acidophilus* e inulina), após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a -18°C .

Sorvetes	Armazenamento (Dias)	pH	Acidez titulável (%)
T1	7	6,69 \pm 0,33 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	14	6,74 \pm 0,05 ^{Aa}	0,17 \pm 0,01 ^{Aa}
	21	6,71 \pm 0,10 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	28	6,57 \pm 0,06 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
T2	7	6,83 \pm 0,30 ^{Aa}	0,16 \pm 0,00 ^{Aa}
	14	6,65 \pm 0,14 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	21	6,88 \pm 0,52 ^{Aa}	0,15 \pm 0,01 ^{Aa}
	28	6,68 \pm 0,04 ^{Aa}	0,15 \pm 0,01 ^{Aa}
T3	7	6,16 \pm 0,06 ^{Aa}	0,20 \pm 0,00 ^{Aa}
	14	6,30 \pm 0,02 ^{Aa}	0,19 \pm 0,00 ^{Aa}
	21	7,25 \pm 0,21 ^{Bb}	0,21 \pm 0,00 ^{Aa}
	28	7,67 \pm 0,12 ^{Bb}	0,20 \pm 0,00 ^{Aa}
T4	7	6,92 \pm 0,09 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	14	6,74 \pm 0,11 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	21	6,75 \pm 0,19 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	28	6,94 \pm 0,40 ^{Aa}	0,15 \pm 0,01 ^{Aa}

^{A,B}: letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes sorvetes avaliados no mesmo período de armazenamento.

^{a,b}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada sorvete avaliado.

Os valores médios obtidos para pH foram 6,68 (T1); 6,76 (T2); 6,84 (T3) e 6,84 (T4), demonstrando que os sorvetes se mantiveram com pH próximo à neutralidade, fator que pode favorecer a viabilidade do probiótico nessa matriz alimentar. Os valores médios de acidez dos sorvetes foram 0,16% (T1); 0,15% (T2); 0,20% (T3) e 0,16% (T4), não tendo sido verificada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre eles.

Diferentemente do observado neste trabalho, Akalin e Erisir (2008) verificaram que o sorvete controle (sem probiótico e prebiótico) apresentou valores de pH superiores, e acidez inferior aos sorvetes contendo probiótico e probiótico com inulina.

Başıyigit, Kuleaşan e Karahan (2006) avaliaram a adição de diferentes lactobacilos em sorvete produzido com sacarose ou aspartame e, constataram que a acidez do sorvete inoculado com cultura fermentada foi maior do que a do sorvete com adição direta, provavelmente, devido à conversão da lactose em ácido láctico durante a fermentação do inóculo. O pH dos produtos variou entre 5,5, quando utilizada cultura fermentada e, 6,6, quando os microrganismos foram adicionados diretamente; sendo este último semelhante aos valores encontrados no presente trabalho.

Em estudo conduzido por Nousia, Androulakis e Fletouris (2011) sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 em sorvete probiótico e sua influência na aceitação sensorial, os sorvetes foram inoculados diretamente com o probiótico liofilizado ou com o probiótico previamente ativado. Os valores de pH obtidos para os sorvetes foram 6,71 e 6,70 respectivamente, assemelhando-se aos resultados encontrados neste trabalho.

Di Criscio et al. (2010) não observaram diferenças significativas em relação aos parâmetros físico-químicos dos sorvetes controle, probiótico, prebiótico com adição de 2,5% de inulina e simbiótico, assemelhando-se aos resultados deste estudo.

Buyck, Baer e Choi (2011) encontraram valores de pH dos sorvetes próximos à neutralidade, sendo 6,92 para o sorvete light e 6,50 para o sorvete não light, enquanto a acidez titulável média observada foi de 0,18 e 0,20, respectivamente.

3.3 Análises microbiológicas

3.3.1 Análise de contaminantes

Não foram verificados bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli* e

Staphylococcus coagulase positiva nas formulações elaboradas.

3.3.2 Avaliação das populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5

As formulações T1 e T2 apresentaram populações de La-5 acima de 7,00 log UFC/g durante todo o período de 28 dias (tabela 5). Portanto, esses sorvetes podem ser considerados alimentos probióticos, uma vez que as contagens se apresentaram superior à exigida pela legislação brasileira (ANVISA, 2008).

Tabela 5. Populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (média \pm desvio-padrão) obtidas para os sorvetes T1 (simbiótico, com adição de *L. acidophilus* e inulina) e T2 (adição de *L. acidophilus*), após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a -18°C .

Armazenamento (dias)	Populações de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (log UFC/g)	
	Sorvetes	
	T1	T2
7	7,60 \pm 0,14 ^{Aa}	7,43 \pm 0,24 ^{Aa}
14	7,51 \pm 0,03 ^{Aa}	7,60 \pm 0,07 ^{Aa}
21	7,52 \pm 0,09 ^{Aa}	7,46 \pm 0,23 ^{Aa}
28	7,47 \pm 0,10 ^{Aa}	7,45 \pm 0,27 ^{Aa}

^A: letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes sorvetes avaliados no mesmo período de armazenamento.

^a: letras minúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada sorvete avaliado.

Não foram verificadas diferenças ($p > 0,05$) nas populações de *L. acidophilus* entre as formulações T1 e T2, nos diferentes períodos analisados, demonstrando que a inulina não estimulou, nem inibiu, a multiplicação do probiótico no sorvete. Da mesma forma, durante as quatro semanas de armazenamento, as populações de La-5 mantiveram-se constantes ($p > 0,05$) nas duas formulações.

Akalin e Erişir (2008), ao produzirem um sorvete com baixo teor de gordura adicionado de La-5 e inulina, observaram que apesar da adição do prebiótico, as contagens de La-5 no sorvete inoculado com inulina não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas às do sorvete com La-5 sem o prebiótico, semelhantemente ao verificado neste trabalho.

Pandiyani et al. (2012) avaliaram o efeito da incorporação de inulina na viabilidade de *L. acidophilus* adicionado em sorvete e verificaram que a multiplicação do probiótico foi superior no sorvete suplementado com inulina, provavelmente devido o efeito prebiótico da mesma.

No estudo de Di Criscio et al. (2010), a contagem de microrganismos probióticos

em sorvete simbiótico foi maior que a observada no sorvete probiótico. Além disso, segundo os autores; a redução na população de probióticos durante o armazenamento não foi significativa, e a presença de inulina não influenciou as populações probióticas, que permaneceram com valores de 6 e 7 log UFC/g.

Akin, Akin e Kirmaci (2007), relataram que a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em sorvete melhorou à medida em que a concentração de inulina foi aumentada, devido ao seu efeito prebiótico. As análises foram realizadas por um período de 90 dias e no sorvete sem adição de inulina a redução nas populações do probiótico foi superior às observadas no sorvete contendo inulina, sugerindo que a adição desse prebiótico estimulou a multiplicação de *L. acidophilus*.

De acordo com os autores, o declínio na contagem de probióticos é resultante do congelamento, que causa a injúria da célula bacteriana e eventualmente leva à sua morte. Além disso, o estresse mecânico e a incorporação de ar aos quais o microrganismo foi submetido durante a produção do sorvete certamente influenciaram a redução dessas populações.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a cepa probiótica utilizada (*Lactobacillus acidophilus* La-5) é adequada para ser incorporada nesse tipo de alimento, sendo resistente aos desafios tecnológicos do processo de manufatura do sorvete, como batimento da calda, incorporação de oxigênio no produto e temperatura de estocagem. Dentre esses fatores, o overrun, definido como incorporação de ar à calda durante o batimento, pode afetar drasticamente a viabilidade de probióticos em sorvete, efeito não observado para La-5 neste trabalho. Os valores médios de overrun obtidos para as formulações de sorvete contendo inulina foram de 56% e para as formulações sem inulina, foram de 51%. Esta porcentagem de incorporação de ar não afetou o probiótico, uma vez que as populações se mantiveram acima de 7,00 log UFC/g nos sorvetes durante todo o período de armazenamento.

Ferraz et al. (2012) produziram sorvetes com 45%, 60% e 90% de incorporação de ar e, observaram que nos produtos com overrun de 60% e 90% houve redução significativa de 14% e 24% respectivamente, nas populações do probiótico adicionado; a contagem de probióticos não sofreu alteração ao longo do período de estocagem no sorvete com 45% de overrun. Apesar das reduções, todas as formulações mantiveram populações probióticas acima de 6 log UFC/g, sendo todos os sorvetes considerados probióticos.

Nousia, Androurakis e Fletouris (2011) obtiveram valores para overrun de 53 e 55% para as formulações de sorvete inoculado com probiótico liofilizado e sorvete inoculado com probiótico previamente ativado respectivamente, sendo que o probiótico, liofilizado ou ativado, não gerou efeito sobre a incorporação de ar no sorvete.

Em estudo sobre o desenvolvimento de sorvete probiótico, prebiótico e simbiótico, Di Criscio et al. (2010) observaram que a taxa de overrun para o sorvete controle foi 37% e com inulina variou de 37,2 a 38,4%, conforme o aumento na concentração de inulina, semelhante ao encontrado nesse trabalho, onde as formulações contendo inulina apresentaram valores superiores para overrun.

3.3 Textura

A dureza, resistência do sorvete à deformação por uma força externa, é um dos fatores determinantes da qualidade do sorvete. Tal parâmetro é relacionado com a proporção de água congelada e inversamente relacionado com a incorporação de ar ao produto (INOUE et al., 2009). A tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a análise de dureza para as diferentes formulações de sorvete estudadas.

Tabela 6. Avaliação do parâmetro dureza (média \pm desvio-padrão) obtido para os sorvetes T1 (simbiótico, com adição de *L. acidophilus* e inulina), T2 (adição de *L. acidophilus*), T3 (adição de inulina) e T4 (controle, sem adição de *L. acidophilus* e inulina), após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

Sorvetes	Armazenamento (Dias)	Dureza (N)
T1	7	0,18 \pm 0,01 ^{Aa}
	14	0,15 \pm 0,03 ^{Aa}
	21	0,23 \pm 0,02 ^{Ab}
	28	0,24 \pm 0,01 ^{Ab}
T2	7	0,22 \pm 0,03 ^{Aa}
	14	0,15 \pm 0,03 ^{Ab}
	21	0,29 \pm 0,04 ^{Aa}
	28	0,27 \pm 0,03 ^{Aa}
T3	7	0,23 \pm 0,02 ^{Aa}
	14	0,18 \pm 0,05 ^{Ab}
	21	0,21 \pm 0,04 ^{Aa}
	28	0,20 \pm 0,03 ^{Aa}
T4	7	0,21 \pm 0,01 ^{Aa}
	14	0,15 \pm 0,03 ^{Ab}
	21	0,21 \pm 0,03 ^{Aa}
	28	0,19 \pm 0,04 ^{Aab}

^A: letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes sorvetes avaliados no mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada sorvete avaliado.

Os resultados obtidos na análise de textura demonstraram que os valores médios de dureza foram 0,20 N para os sorvetes contendo inulina, 0,23 N para T2 e 0,19 N para T4. Pode-se observar que as formulações não diferiram entre si em cada dia de análise; porém, os resultados demonstram diferença estatística significativa durante o tempo analisado para uma mesma formulação: T1 apresentou aumento a partir do dia 21; e as outras formulações apresentaram redução da dureza no dia 14.

Os açúcares contidos no sorvete possuem duas funções principais: a de adoçar o produto e controlar o teor total de gelo, influenciando na maciez e viscosidade do alimento (VARELA; PINTOR; FISZMAN, 2014). Embora a inulina, por ser substituta de açúcar, possa aumentar a maciez do sorvete quando adicionada ao mesmo, isto não foi observado neste trabalho, uma vez que a formulação T1 apresentou aumento da dureza, entre os dias 21 e 28 ($p < 0,05$). Para outra formulação adicionada de inulina (T3) observou-se comportamento diferente, uma vez que não

houve variação na dureza ($p > 0,05$) durante todo o armazenamento.

Em estudo realizado por Pintor, Severiano-Pérez e Totosaus (2013), sobre a otimização da produção de sorvete com teor de gordura reduzido, empregando inulina como substituto de gordura, os sorvetes adicionados de inulina apresentaram menor dureza, possuindo uma textura mais macia, quando comparados aos sorvetes sem inulina. Por outro lado, Di Criscio et al. (2010) desenvolveram sorvetes probiótico, prebiótico e simbiótico, e observaram que a adição de inulina resultou no aumento da dureza do sorvete.

3.4 Análise Sensorial

A análise sensorial é de extrema importância quando se desenvolve um novo alimento funcional, particularmente do tipo probiótico, uma vez que a inserção desses microrganismos no alimento pode resultar em modificações do mesmo quando comparado ao convencional (SOUZA et al., 2008).

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos para a análise sensorial das diferentes formulações de sorvete estudadas.

Tabela 7. Resultados (média) obtidos para a aceitação sensorial dos sorvetes T1 (simbiótico, com adição de *L. acidophilus* e inulina), T2 (adição de *L. acidophilus*), T3 (adição de inulina) e T4 (controle, sem adição de *L. acidophilus* e inulina), após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a -18°C .

Armazenamento (dias)	Formulações			
	T1	T2	T3	T4
7	7,60 ^{Aa}	7,36 ^{Aa}	7,10 ^{Aa}	8,06 ^{Aa}
14	7,06 ^{Aa}	7,04 ^{Aa}	7,48 ^{Aa}	7,60 ^{Aa}
21	7,58 ^{Aa}	7,66 ^{Aa}	7,10 ^{Aa}	7,80 ^{Aa}
28	7,50 ^{Aa}	7,80 ^{Aa}	7,06 ^{Aa}	7,92 ^{Aa}

^A: letras maiúsculas iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes sorvetes avaliados no mesmo período de armazenamento.

^a: letras minúsculas iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada sorvete avaliado.

No presente estudo não foram detectadas diferenças para um mesmo sorvete ao longo do armazenamento e nem entre as formulações em um mesmo período de tempo ($p < 0,05$), no entanto, os provadores relataram que as formulações contendo inulina eram mais doces e macias, sendo mais agradáveis ao paladar, além de apresentarem coloração mais clara.

Resultados semelhantes foram verificados por outros autores, como Nousia, Androulakis e Fletouris (2011), que não obtiveram diferença entre os sorvetes controle e probiótico, em relação à aceitação por provadores, na 15ª e na 45ª semanas de armazenamento.

Em estudo conduzido por Homayouni et al. (2008), a análise sensorial revelou que as formulações simbiótica (prebiótico + *L. casei*) e prebiótica não diferiram entre si, apresentando boa aceitação. Da mesma forma, no presente trabalho, as formulações T1 e T3 também apresentaram boa aceitação, não diferindo estatisticamente das demais.

Pintor, Severiano-Pérez e Totosaus (2013) também concluíram que o sorvete contendo inulina não diferiu sensorialmente do controle, semelhantemente ao encontrado neste estudo. Porém, em estudo conduzido por Di Criscio et al. (2010), o sorvete controle obteve pontuação maior que o sorvete probiótico na análise sensorial. O sorvete prebiótico, com adição de 2,5% de inulina, assemelhou-se ao controle, enquanto os sorvetes com maiores concentrações de inulina (5% e 10%) obtiveram notas inferiores aos demais. Os autores afirmaram que a adição do probiótico com a inulina não afetou os parâmetros avaliados, igualmente ao observado neste estudo.

4. Conclusão

O microrganismo probiótico *L. acidophilus* La-5 é capaz de sobreviver aos processos de fabricação e período de estocagem do sorvete, mantendo suas populações acima do exigido pela legislação brasileira, demonstrando que o sorvete pode ser transformado em um alimento funcional. A inulina não exerceu efeito significativo sobre a viabilidade do La-5 no alimento. Além disso, a adição da inulina e do La-5 não alteraram significativamente as características físico-químicas, centesimais e a incorporação de ar (overrun) do sorvete, assim como a textura. Os resultados da análise sensorial revelaram excelente aceitação dos produtos, uma vez que as notas variaram entre "gostei moderadamente" e "gostei muito", caracterizando os sorvetes como produtos de grande potencial de consumo.

5. Referências

AKALIN, A.S.; ERIŞİR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low fat probiotic ice cream. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 184-188, may, 2008.

AKIN, M.B.; AKIN, M.S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, p. 93-99, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos**. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>>. Acesso em: 17 set. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista das alegações aprovadas de 11 de janeiro de 2005. Atualizada em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 13 nov. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. **Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias>>. Acesso em: 12 abr. 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15 ed. Washington, 1995. 109 p.

BAŞYIĞIT, G.; KULEAŞAN, H.; KARAHAN, A.G. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 796-800, sep., 2006.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). **Nutrition and Food Science**, v. 28, n. 1, p. 41-48, 1998a.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. **Nutrition and Food Science**, v. 28, n. 2, p. 102-108, 1998b.

BUYCK, J.R.; BAER, R.J.; CHOI, J. Effect of storage temperature on quality of light and full-fat ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2213-2219, may, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. São Paulo: Artmed, 2003.

DI CRISCIO, T, et al. Production of functional probiotic, prebiotic and symbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p.4555-4564, oct, 2010.

DUTCOVSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 2013.531p.

FERRAZ, J.L. et al. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. 24-28, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_ en.pdf.>. Acesso em: 03 fev. 2005. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. Ice Cream and Frozen Desserts. In: HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. cap. 154. p. 154-2-154-45.

GREG KELLY, N.D. Inulin-Type Prebiotics – A Review: Part 1. **Alternative Medicine Review**, v. 13, n. 4, p. 315-329, dec., 2008.

HOIER, E. et al. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: Law, B.A., **Technology of cheesemaking**. CRC Press, Boca Raton, 1999. pp. 99-131.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50-55, nov., 2008.

INOUE, K. et al. Modeling of the effect of freezer conditions on the hardness of ice cream using response surface methodology. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.12, p. 5834-5842, 2009.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Fermented and non-fermented milk products. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus***. Culture media. Bulletin of the IDF 306. Brussels: IDF, 1995. p.23-33.

JAIN, P.K. et al. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La 5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 467-475, aug., 2004.

KARAMAN, S. et al. Physicochemical, bioactive, and sensory properties of persimmon-based ice cream: technique for order preference by similarity to ideal solution to determine optimum concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 97-110, 2014.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Foods: Principles and Practices**. Gaithersburg: Aspen, 1999. 827p.

MARSHALL, R.T. Frozen Desserts In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. 2nd. New York: Marcel Dekker, 2001. cap. 4. p. 93-125.

MARSHALL, R.T.; GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. The ice cream industry. In: _____ . **Ice cream**. 6rd. New York: Elsevier, 2003. cap. 1. p.1-10.

MUSE, M.R.; HARTEL, R.W. Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 1-10, 2004.

NOUSIA, F.G.; ANDROULAKIS, P.I.; FLETOURIS, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 1-7, feb., 2011.

PANDIYAN, C. et al. Effect of incorporation of inulin on the survivability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic ice cream. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1729-1732, 2012.

PINTOR, A.; SEVERIANO-PÉREZ, P.; TOTOSAUS, A. Optimization of fat-reduced ice cream formulation employing inulin as fat replacer via response surface methodology. **Food Science and Technology International**,

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, mar., 2007.

ROY, D. Technological aspects related to the use of Bifidobacteria in dairy products. **Lait**, v.85, p.39-56, 2005.

SAAD, S.M.I. et al. Probióticos e prebióticos em alimentos: Aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G. da; FARIA, J. de A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1ed. São Paulo: Varela, 2011. cap. 1. p. 23-50.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, jan./mar., 2006.

SANDERS, M.E. Probiotics: Considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, mar., 2003.

SILBERNAGEL, K.M.; JECHOREK, R.P.; CARVER, C.N. 3M™ Petrifilm™ Staph Express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.86, n.5, p.963-970, 2003.

SOUZA, C.H.B. et al. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n.5, p. 871-877, 2008.

STATSOFT INC., Statistica for Windows, Version 8.0, 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104, USA.

TAIPALE, T. et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 409-416, 2011.

VARELA, P.; PINTOR, A.; FISZMAN, S. How hydrocolloids affect the temporal oral perception of ice cream. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 220-228, may, 2014.

5 ARTIGO 2

VIABILIDADE DAS CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus acidophilus* La-5 E *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ADICIONADAS EM SORVETE

VALÉRIO, G. D.¹; CASTRO, E. M.¹; KIMURA, S.F.¹; SANTANA, E. H. W.¹; ARAGON-
ALEGRO, L. C.¹; SOUZA, C. H. B.^{1*}

¹ Universidade Norte do Paraná – UNOPAR – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Rua Marselha, 591, Jardim Piza, 86041-140, Londrina, PR, Brasil.

* Corresponding author: C. H. B. Souza

E-mail: cinthiahoch@yahoo.com.br

Tel.: +55 43 3371-7993

Fax: +55 43 3371-7834

Running headline: Sorvete funcional adicionado de duas espécies probióticas.

Resumo

O sorvete, alimento de alto valor nutricional e amplamente consumido, apresenta-se como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de um alimento funcional. Para se tornar tal produto, o mesmo pode ser enriquecido com a adição de microrganismos probióticos. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi desenvolver três formulações de sorvetes funcionais adicionados dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e avaliar a viabilidade e as características físico-químicas dos sorvetes. Para isso, três formulações de sorvetes foram produzidas em triplicata: T1 (controle – sem adição de La-5 e Bb-12), T2 (probiótico - com adição de La-5) e T3 (probiótico - com adição de Bb-12). As análises de viabilidade dos probióticos e físico-químicas (pH e acidez) foram realizadas semanalmente durante 28 dias, durante o armazenamento dos sorvetes (-18°C). As contagens de La-5 foram superiores a 7 log UFC/g durante todo o período de armazenamento, o mesmo foi observado para Bb-12. Após 7 dias de armazenamento, foram observadas populações de La-5 em torno de 7,43 log UFC/g (T2) e 8,38 (T3) log UFC/g para Bb-12. No dia 28, observou-se as populações de La-5 em 7,45 (T2) e Bb-12 em 8,04 log UFC/g (T3). Não foram observadas reduções significativas no final do armazenamento para os microrganismos: La-5 apresentou populações de 7,48 log UFC/g e Bb-12 apresentou populações de 7,88 log UFC/g. Os valores médios de pH entre os dias 7 e 28 foram 6,76 (T2) e 6,64 (T3). No mesmo período, T2 apresentou valor médio de 0,16% de acidez, enquanto T3 apresentou valor médio de 0,17%. Estes resultados demonstram que La-5 e Bb-12 são microrganismos viáveis para inserção nessa matriz alimentar, uma vez que os sorvetes apresentaram populações satisfatórias de ambos os microrganismos, mantendo-se acima do mínimo exigido pela legislação brasileira (6 log UFC / g). Portanto, o sorvete pode ser considerado uma excelente matriz alimentar para carrear microrganismos probióticos.

Palavras-chave: Sorvete. Funcional. Probiótico. Prebiótico.

Abstract

The ice cream, high nutritional value and widely consumed food, is presented as a promising alternative for the development of a functional food. To make such a product, it can be fortified with the addition of probiotic microorganisms. In view of this, the aim of this study was to develop three functional ice cream formulations of added probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 and assess the feasibility and the physicochemical characteristics of the ice cream. For this purpose, three ice cream formulations were produced in triplicate: T1 (control - no addition of La-5 and P-12), T2 (probiotic - with addition of La-5) and T3 (probiotic - with the addition of Bb-12). The viability of probiotics analysis and physico-chemical properties (acidity and pH) were performed weekly for 28 days, during storage of the ice cream (18 ° C). La-5 counts were greater than 7 log CFU / g during the storage period, it was observed for P-12. After 7 days of storage, La-5 populations were observed around 7.43 log CFU / g (T2) and 8.38 (T3) log CFU / g for P-12. On day 28, there was La-populations at 7.45 5 (T2) and P-12 8.04 log CFU / g (T3). Significant reductions were observed at the end of storage for microorganisms: La-5 had populations of 7.48 log CFU / g Bb-12 had populations of 7.88 log CFU / g. The average values of pH between 7 and 28 were 6.76 (T2) and 6.64 (T3) .In the same period, T2 averaged 0.16% of acidity, while T3 averaged 0, 17%. These results demonstrate that La-5 and P-12 are viable

microorganisms for inserting food matrix that, once the ice cream had satisfactory both populations of microorganisms remained above the minimum required by Brazilian law (6 log CFU / g). Therefore, the ice cream can be considered an excellent food matrix to adduce probiotic microorganisms.

Keywords: Ice cream. Functional. Probiotic. Prebiotic.

1. Introdução

Com o aumento da expectativa de vida e a preocupação com a saúde por parte da população, os alimentos funcionais estão ganhando popularidade entre os consumidores. Esses alimentos, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde através de alguns fatores não previstos pela nutrição convencional, sendo importante destacar que seus efeitos são de prevenção, e não de cura de doenças (SAAD, 2006; OLIVEIRA et al., 2002; ANVISA, 2005; KOMATSU et al., 2008).

A fim de se elaborar um alimento funcional, podem-se adicionar substâncias prebióticas e/ou microrganismos probióticos em sua matriz alimentar.

Os alimentos funcionais, além de contribuírem com a nutrição, contêm substâncias bioativas, que afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo. O probiótico age na regulação e na manutenção da integridade da barreira gastrintestinal, auxiliando também na inibição da multiplicação de patógenos (SAAD, 2006; KOMATSU et al., 2008; BOIRIVANT et al., 2007).

Probióticos são microrganismos vivos, não patogênicos, que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Para que um microrganismo seja considerado probiótico, é necessário, dentre outros quesitos, que ele seja de origem humana, não patogênico, resistente à ação da bile, ácido clorídrico e pancreatina, exerça atividade antimicrobiana e seja capaz de colonizar o intestino humano (SAAD, 2006; KOMATSU et al., 2008).

A ação benéfica para a saúde por parte desses microrganismos depende do consumo diário, bem como da quantidade adequada ingerida, o que segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é de pelo menos 8-9 log de unidades formadoras de colônias (UFC) (ANVISA, 2008).

Dentre os efeitos benéficos proporcionados pelos probióticos, pode-se citar: a regulação intestinal, promoção da digestão da lactose, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, produção de vitaminas, homeostase microbiana,

inibição de enzimas pró-cancerígenas, prevenção de infecções urogenitais e estímulo da multiplicação de bactérias benéficas com reposição da microbiota intestinal sadia (SAAD, 2006; KOMATSU et al., 2008; BOIRIVANT et al., 2007).

O sorvete pode ser uma matriz alimentar ideal para a veiculação de microrganismos probióticos, uma vez que os alimentos lácteos são os que mais se destacam para tal função (CRUZ, 2009). Algumas características desse produto, como sua composição (proteína, gorduras e lactose) e pH próximo à neutralidade, podem influenciar satisfatoriamente as populações probióticas durante o seu armazenamento (HOMAYOUNI, 2008).

Por ser um produto de consumo elevado pela população, o sorvete se apresenta como uma alternativa promissora de veículo carreador de microrganismos probióticos, levando a crer que o desenvolvimento de novas formulações de sorvetes sejam atrativas ao consumidor.

O objetivo do presente trabalho foi a produção de duas formulações de sorvete probióticos, utilizando duas cepas distintas comprovadamente probióticas, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, além de comparar as formulações de sorvetes quanto às características físico-químicas (pH e acidez) e centesimal.

2. Material e Métodos

2.1 Ingredientes para a fabricação dos sorvetes

Para as produções das diferentes formulações de sorvetes foram utilizados os seguintes ingredientes: leite integral UHT (Tirol®, Treze Tílias, Brasil), açúcar refinado (Alto Alegre®, Presidente Prudente, Brasil), creme de leite UHT (Polly®, Londrina, Brasil), leite condensado (Mococa®, Mococa, Brasil), emulsificante Emustab® (Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul, Brasil), estabilizante (Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul, Brasil), aroma de baunilha (Mix®, São Bernardo do Campo, Brasil), cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* (Christian Hansen®, Hoersholm, Dinamarca). As variáveis empregadas na fabricação das formulações e as proporções de cada ingredientes estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Os sorvetes foram processados de acordo com as etapas descritas na Figura 1.

Tabela 1. Variáveis empregadas na fabricação dos sorvetes.

Sorvetes	<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> **
T1***	-	-
T2	+	-
T3	-	+

+ = Presença – = Ausência.

* Cultura probiótica: *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

** Cultura probiótica: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

*** T1: formulação controle.

Tabela 2. Ingredientes e suas respectivas quantidades utilizadas em cada formulação de sorvete elaborada.

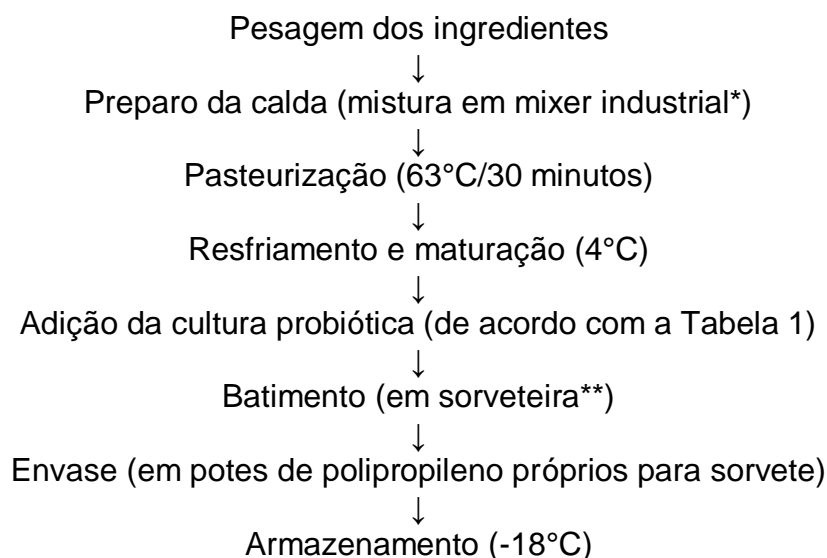
Ingredientes	Sorvetes		
	T1*	T2	T3
Leite integral	4000 mL	4000 mL	4000 mL
Creme de leite	1200 g	1200 g	1200 g
Leite condensado	1185 g	1185 g	1185 g
Açúcar refinado	300 g	300 g	300 g
Emulsificante	150 g	150 g	150 g
Estabilizante	150 g	150 g	150 g
Essência de baunilha	15 mL	15 mL	15 mL
La-5**	-	4 g	-
Bb-12***	-	-	4 g

* T1: formulação controle

** Cultura probiótica: *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

*** Cultura probiótica: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca).

– = Ausência.



* Etapa realizada em Mixer 15 (Finamac, São Paulo, Brasil).

** Etapa realizada em sorveteira (Polo Sul, São Carlos, Brasil).

Figura 1. Fluxograma para fabricação dos sorvetes.

2.2 Período de armazenamento

Os sorvetes foram armazenados em freezer a -18°C por um período de 28 dias para realização das análises. Foram realizadas análises microbiológicas, pH e acidez livre titulável semanalmente. A análise centesimal foi realizada após 1 dia de armazenamento dos sorvetes.

2.3 Análises microbiológicas

2.3.1 Avaliação das populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5

Para a avaliação das populações de La-5, foram homogeneizadas porções de 25 gramas de sorvete com 225 mL de água peptonada 0,1%, utilizando-se um “Bag Mixer” (Interscience, St. Nom, França), com diluições decimais subsequentes no mesmo diluente. Alíquotas de 1 mL das diluições foram transferidas para placas de Petri estéreis, adicionadas posteriormente de ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS), fundido e resfriado a 45°C. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1995). As análises foram realizadas em duplicata.

2.3.2 Avaliação das populações de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12

Para a quantificação da cultura probiótica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras preparadas de acordo com o item 2.3.1 foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida foi adicionado ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS, Himedia, Mumbai, Índia), acrescido de propionato de sódio (3%) e cloreto de lítio (2%) (Oxoid, Cheshire, Inglaterra) - ágar LP-MRS. Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 3 dias, em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid) (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000). As análises foram realizadas em duplicata.

2.4 Determinação do pH, acidez livre titulável e composição centesimal

Foram realizadas as análises de pH com auxílio de potenciômetro (Tecnal, Piracicaba, Brasil) e acidez livre titulável através de titulação com solução Dornic. As determinações de lipídeos, proteínas, extrato seco total, cinzas e umidade foram realizadas, no dia seguinte à produção. Todas as análises foram realizadas de acordo com metodologia preconizada pela Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1995). O teor de carboidratos foi calculado por diferença. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o software STATISTICA v.8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). A normalidade dos resultados e a homogeneidade de variâncias foram avaliadas através do teste de Shapiro-Wilks e Brown-Forsythe, respectivamente, adotando-se α de 0,05. Quando a homogeneidade de variância não foi observada, os dados foram tratados através de análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Kruskal Wallis e o teste de Mann Whitney U para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998b). Quando a homogeneidade de variâncias foi observada, procedeu-se à análise de variância paramétrica e consequente aplicação do teste de Tukey para a identificação das diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) (BOWER, 1997; BOWER, 1998a; BOWER, 1998b; CALLEGARI-JAQUES, 2003). Para as comparações entre os diferentes períodos de armazenamento para uma mesma formulação: quando a homogeneidade de variância não foi observada, os dados

foram tratados pela análise de variância não-paramétrica, com aplicação do teste de Friedman e o “LSD rank” para identificação dos contrastes ($p < 0,05$) (BOWER, 1998b). Quando houve a homogeneidade de variâncias, procedeu-se a análise de variância para medidas repetidas e aplicação do teste de Tukey para detectar as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias (BOWER, 1998a).

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise centesimal

A tabela 3 apresenta os valores obtidos para os teores de lipídeos, proteína, carboidrato, cinzas e umidade.

Tabela 3. Análise centesimal (média \pm desvio-padrão) obtidos para os sorvetes T1 (controle, sem adição de *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição de *B. animalis* subsp. *lactis*), após 1 dia de armazenamento a -18°C .

Composição (%)	Sorvetes		
	T1	T2	T3
Lipídeos	8,28 \pm 0,14 ^A	7,75 \pm 0,20 ^B	7,44 \pm 0,55 ^B
Proteína	2,87 \pm 0,42 ^A	2,87 \pm 0,28 ^A	3,25 \pm 0,03 ^A
Cinza	0,83 \pm 0,02 ^A	0,92 \pm 0,01 ^A	0,96 \pm 0,04 ^A
Umidade	66,62 \pm 0,17 ^A	67,30 \pm 0,20 ^A	67,99 \pm 0,07 ^A
Carboidratos	21,39 \pm 0,47 ^A	21,15 \pm 0,27 ^A	20,37 \pm 0,65 ^A

^{A,B}: letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes sorvetes avaliados no mesmo período de armazenamento.

As formulações controle (T1), La-5 (T2) e Bb-12 (T3) apresentaram valores próximos de composição, demonstrando assim, que a adição de La-5 e Bb-12 não altera a composição dos sorvetes. Os teores de proteína, cinzas, umidade e carboidratos não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$), porém, o teor de lipídeos foi maior nos sorvetes T2 e T3 ($p < 0,05$) quando comparadas ao sorvete controle, provavelmente devido à composição da matéria prima, uma vez que lotes diferentes de leite foram utilizados para as produções.

3.2 Análises físico-químicas

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para as análises de pH e acidez obtidos para as 3 formulações de sorvetes desenvolvidas, durante o período de 28 dias.

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos (média \pm desvio-padrão) obtidos para os sorvetes T1 (controle, sem adição de *L. acidophilus* ou *B. animalis* subsp. *lactis*), T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição *B. animalis* subsp. *lactis*), após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a -18°C .

Sorvetes	Tempo de Armazenamento (Dias)	pH	Acidez titulável (%)
T1	7	6,92 \pm 0,09 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	14	6,74 \pm 0,11 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	21	6,75 \pm 0,19 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	28	6,94 \pm 0,40 ^{Aa}	0,15 \pm 0,01 ^{Aa}
T2	7	6,83 \pm 0,30 ^{Aa}	0,16 \pm 0,00 ^{Aa}
	14	6,65 \pm 0,14 ^{Aa}	0,16 \pm 0,01 ^{Aa}
	21	6,88 \pm 0,52 ^{Aa}	0,15 \pm 0,01 ^{Aa}
	28	6,68 \pm 0,04 ^{Ba}	0,15 \pm 0,01 ^{Aa}
T3	7	6,59 \pm 0,04 ^{Ba}	0,16 \pm 0,00 ^{Aa}
	14	7,07 \pm 0,09 ^{Bb}	0,17 \pm 0,01 ^{Aa}
	21	6,39 \pm 0,02 ^{Ba}	0,17 \pm 0,01 ^{Aa}
	28	6,51 \pm 0,04 ^{Ba}	0,17 \pm 0,01 ^{Aa}

^{A,B}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes sorvetes estudados para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b}: letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada sorvete estudado.

Para as formulações controle (T1) e com adição de *L. acidophilus* (T2), ao longo do período de armazenamento (7 a 28 dias), os valores de pH e acidez não apresentaram alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Para a formulação T3, não se observou diferença em relação à acidez. Porém, o pH de T3, apresentou valores maiores no 14^o dia ($p < 0,05$), quando comparado aos demais tempos. Dessa forma, observou-se que a adição desses probióticos ao sorvete não afetou o pH e a acidez dos sorvetes, que permaneceram semelhantes aos observados para a formulação controle.

Igualmente, estudos conduzidos por Di Criscio et al. (2010) e Buyck, Baer e Choi (2011) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes formulações de sorvetes desenvolvidas: controle e probiótico, e light e não light, respectivamente.

Diferentemente do observado neste trabalho, Akalin e Erişir (2008) obtiveram valores de pH e acidez para os sorvetes controle e probiótico estatisticamente diferentes, uma vez que o controle apresentou valor de pH superior ao probiótico, e acidez inferior.

3.3 Avaliação das populações das culturas probióticas

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a quantificação das populações das culturas probióticas utilizadas neste trabalho (*L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*), no período de 7 a 28 dias de armazenamento congelado dos produtos.

Tabela 5. Populações* das culturas probióticas (média \pm desvio-padrão) obtidas para os sorvetes T2 (adição de *L. acidophilus*) e T3 (adição *B. animalis* subsp. *lactis*), após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a -18°C .

Sorvetes	Armazenamento (Dias)	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
T2	7	7,43 \pm 0,24 ^{Aa}	-
	14	7,60 \pm 0,07 ^{Aa}	-
	21	7,46 \pm 0,23 ^{Aa}	-
	28	7,45 \pm 0,27 ^{Aa}	-
T3	7	-	8,38 \pm 0,05 ^{Ba}
	14	-	7,94 \pm 0,15 ^{Ab}
	21	-	7,17 \pm 0,01 ^{Ac}
	28	-	8,04 \pm 0,35 ^{Bab}

* log UFC/g.

- : ausência.

^{A,B}: letras maiúsculas diferentes sobrescritas nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as populações de *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis*, nos diferentes sorvetes estudados, para um mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada sorvete estudado.

Para a formulação T2 (com adição de *L. acidophilus*), durante o período de armazenamento, as populações de La-5 se mantiveram acima de 6,00 log UFC/g de produto. Tais resultados estão de acordo com o que a ANVISA estabelece para alimentos probióticos (ANVISA, 2005). A formulação T2 não apresentou variações significativas nessas populações, durante o período de armazenamento ($p > 0,05$).

A formulação T3 (com adição de *B. animalis* subsp. *lactis*) apresentou população inicial de Bb-12 de 8,38 log UFC/g. No decorrer do armazenamento, observou-se variações nessas populações, com decréscimo ao término do armazenamento, quando comparado ao 7º dia (8,04 log UFC/g ao 28º dia). No entanto, as populações de Bb-12 mantiveram-se acima do recomendado pela ANVISA.

Quando as duas formulações foram comparadas, T3 apresentou populações superiores de microrganismo probiótico no 7º e 28º dia ($p < 0,05$).

Grosso e Trindade (2004) avaliaram a estabilidade das mesmas cepas utilizadas no presente trabalho, durante o desenvolvimento de iogurte fermentado com pH 6,4 durante 28 dias de armazenamento. A sobrevivência de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-

12 e *L. acidophilus* foi satisfatória, atingindo 7,00 log UFC/g ao término do armazenamento. Roy (2005) também utilizou *B. animalis* subsp. *lactis* no desenvolvimento de queijo cheddar com pH elevado no período de 28 dias de armazenamento e a sobrevivência da população se manteve acima de 8,00 log UFC/g.

Magariños et al. (2007) observaram a viabilidade *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e *L. acidophilus*, na produção de sorvete com leite desnatado em um período de 60 dias de armazenamento. Os autores verificaram que as populações das duas cepas aumentaram lentamente, devido à falta de atividade proteolítica. Mesmo assim, as populações se mantiveram acima de 6,00 log UFC/g, semelhantemente ao observado no presente trabalho.

Corrales, Henderson e Morales (2007) desenvolveram um sorvete simbiótico contendo Bb-12 e La-5 e demonstraram que a taxa de sobrevivência desses microrganismos foi superior ao mínimo exigido (10^6 UFC/g).

4. Conclusão

O desenvolvimento de duas formulações de sorvete probiótico utilizando duas cepas distintas (*Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) foi possível, uma vez que observou-se sobrevivência satisfatória dessas cepas, durante o congelamento a -18°C por um período de 28 dias. A viabilidade dos probióticos permaneceu elevada até o final do período de armazenamento estudado. Os resultados encontrados nesse estudo demonstraram que a adição dessas duas cepas em sorvetes pode ser realizada, uma vez que a incorporação de ar decorrente do batimento para congelamento da calda, principal etapa tecnológica da produção de sorvetes que pode afetar as populações de microrganismos probióticos em sorvetes, não afetou as populações de La-5 e Bb-12. Além disso, os produtos desenvolvidos atenderam as recomendações da ANVISA, permitindo que os sorvetes T2 e T3 sejam considerados alimentos funcionais, sendo uma opção saudável para o consumidor.

5. Referências

AKALIN, A.S.; ERIŞİR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of Food Science**, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos. Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista das alegações aprovadas de 11 de janeiro de 2005. Atualizada em julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 13 nov. 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15 ed. Washington, 1995. 109 p.

BOIRIVANT, M.; STROBER, W. The mechanism of action of probiotics. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 679-692, nov., 2007.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. **Nutrition and Food Science**, v. 28, n. 2, p. 102-108, 1998b.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). **Nutrition and Food Science**, v. 28, n. 1, p. 41-48, 1998a.

BUYCK, J.R.; BAER, R.J.; CHOI, J. Effect of storage temperature on quality of light and full-fat ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2213-2219, may, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. São Paulo: Artmed, 2003.

CORRALES, A.; HENDERSON, M.; MORALES, I. Survival of probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in whipped ice cream. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 34, n. 2, p. 157-163, jun., 2007.

CRUZ, A.G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233-1239, nov., 2009.

DI CRISCIO, T. et al. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4555-4564, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf.>. Acesso em: 03 fev. 2005. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

GROSSO, C.R.F.; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 151-156, 2004.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50-55, nov., 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Fermented and non-fermented milk products. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus***. Culture media. Bulletin of the IDF 306. Brussels: IDF, 1995. p.23-33.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, jul./set., 2008.

MAGARIÑOS, H. et al. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 128-134, may, 2007.

OLIVEIRA, M.N. de. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, jan./mar., 2002.

ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait*, v. 85, p. 39-56, 2005.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, jan./mar., 2006.

STATSOFT INC., Statistica for Windows, Version 8.0, 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104, USA.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

6. CONCLUSÃO

Os microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 se mostraram capazes de sobreviver aos processos de fabricação e período de estocagem dos sorvetes desenvolvidos, mantendo suas populações acima do exigido pela legislação brasileira, demonstrando que o sorvete pode ser transformado em um alimento funcional. A inulina não exerceu efeito significativo sobre a viabilidade do La-5 no alimento e tampouco alterou as características físico-químicas, centesimais e a incorporação de ar (overrun) do sorvete, assim como a textura. Os resultados da análise sensorial revelaram excelente aceitação dos produtos, uma vez que as notas variaram entre "gostei moderadamente" e "gostei muito", caracterizando os sorvetes como produtos de grande potencial de consumo. Além disso, os produtos desenvolvidos atenderam as recomendações da ANVISA, permitindo que os sorvetes adicionados de probiótico e/ou inulina sejam considerados alimentos funcionais, sendo uma opção saudável para o consumidor.

7. ANEXOS

7.1 Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná (Parecer nº 453.853)



UNIVERSIDADE NORTE DO
PARANÁ - UNOPAR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE SORVETE SIMBIÓTICO COM POTENCIAL AÇÃO CICATRIZANTE DE DESORDENS DISPÉPTICAS (GASTRITE E ÚLCERA CAUSADAS POR *Helicobacter pylori*)

Pesquisador: Cínthia Hoch Batista de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21115913.4.0000.0108

Instituição Proponente: Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Patrocinador Principal: Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 453.853

Data da Relatoria: 30/09/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto detalha os procedimentos com clareza e está bem embasado pela revisão bibliográfica.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver um sorvete com probióticos e simbióticos e avaliar a capacidade cicatrizante de úlceras causadas por *Helicobacter pylori* em humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos associados a pesquisa desde que adequadamente conduzidas são baixos pois são de duração curta 30 dias. Benefícios estão associados a possibilidade de se evitar o tratamento medicamentoso que é a base de antibióticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa importante bem embasada com repercussão positiva principalmente para pessoas que eventualmente não possam fazer o tratamento tradicional com antibióticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados. O termo de esclarecimento livre e esclarecido deve conter informação para que no caso da não remissão da úlcera o paciente terá que ser submetido ao tratamento tradicional e que o atraso de 30 dias no tratamento pode ter repercussão sobre o seu

Endereço: Av. Paris 675

Bairro: Jardim Piza

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.041-140

Telefone: (43)3371-7834

E-mail: pesquisa@unopar.br



UNIVERSIDADE NORTE DO
PARANÁ - UNOPAR



Continuação do Parecer: 453.853

caso clínico.

Recomendações:

Recomenda-se que seja alterado no TCLE-endoscopia, item IV, o termo "provador" para "paciente" ou "sujeito da pesquisa", uma vez que caracterizará a segunda etapa do estudo, e não a de análise sensorial.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclui-se de forma favorável à realização do projeto, levando-se em consideração as recomendações acima.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto atende a Resolução CNS No.466/12 e está aprovado segundo os critérios éticos.

LONDRINA, 11 de Novembro de 2013

Assinador por:
Hélio Hiroshi Sugimoto
(Coordenador)

Endereço: Av. Paris 675

Bairro: Jardim Piza

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.041-140

Telefone: (43)3371-7834

E-mail: pesquisa@unopar.br

7.2 Modelo de ficha utilizada na análise sensorial

Nome:.....Data:...../...../.....
Amostra
Você está recebendo uma amostra de sorvete. Por favor, prove a amostra, e em seguida, avalie usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto.
1 - Desgostei muitíssimo
2 - Desgostei muito
3 - Desgostei regularmente
4 - Desgostei ligeiramente
5 - Não gostei nem desgostei
6 - Gostei ligeiramente
7 - Gostei regularmente
8 - Gostei muito
9 - Gostei muitíssimo
O que você mais gostou na amostra?.....
O que você menos gostou na amostra?.....
Comentários:.....
.....
.....
Obrigada pela sua participação!!!